

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Andreja Kupina

**ODREĐIVANJE GENOTOKSIČNOG UČINKA TALIJEVA(I)
ACETATA U DUHANU KOMET TESTOM**

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Ovaj rad, izrađen u Zavodu za molekularnu biologiju, Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom Prof. dr. sc. Mirjane Pavlica i pod pomoćnim vodstvom dipl. inž. Petre Cvjetko, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja prof. biologije i kemije.

Od srca zahvaljujem Prof. dr. sc. Mirjani Pavlica na strpljivosti, razumijevanju i mnogobrojnim stručnim savjetima koje mi je pružila tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Također zahvaljujem dipl. inž. Petri Cvjetko na savjetima i velikoj pomoći prilikom izvođenja eksperimenata i analiziranja uzoraka.

Velika hvala mojim roditeljima na podršci, razumijevanju i strpljenju tokom svih godina studija.

Hvala svim prijateljima i kolegama te mojem Vladimiru koji su mi cijelo vrijeme bili potpora.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

ODREĐIVANJE GENOTOKSIČNOG UČINKA TALIJEVA(I) ACETATA U DUHANU KOMET TESTOM

Andreja Kupina

Zavod za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu
Horvatovac 102a, Zagreb

Talij je teški metal čija se koncentracija u okolišu kontinuirano povećava ljudskom djelatnošću kroz industrije kao što su obrada metalnih ruda, u elektranama koje sagorijevaju ugljen te u cementarama. Na taj način talij i njegovi spojevi postaju biološki raspoloživi te se akumuliraju u živim organizmima a naročito biljkama.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti genotoksičan učinak talijeva(I)acetata na duhan *Nicotiana tabacum* L. var Xanthi komet-testom koji kao nespecifičan biomarker genotoksičnosti jednostavno i brzo pokazuje promjene u molekuli DNA te kao takav ima široku primjenu u ekotoksikološkim istraživanjima i biomonitoringu. Da bi se potvrdila osjetljivost komet-testa korišten je modelni genotoksikant vodikov peroksid koji je na jezgrama stanica duhana u uvjetima *in vitro* pokazao direktno genotoksično djelovanje. Biljke duhana su tri dana izlagane u uvjetima *in vivo* različitim koncentracijama talijeva(I)acetata. Nakon tri dana talij(I)acetat izaziva blago oštećenje molekule DNA u listu dok su oštećenja u korijenu bila veća. Oštećenje DNA linearno raste s porastom koncentracije talija. Kako bi utvrdili mogući mehanizam djelovanja talija na DNA napravljen je i acelularni komet-test u uvjetima *in vitro* na jezgrama lista duhana. Dobiveni rezultati vrlo su slični rezultatima celularnog komet-testa na stanicama korijena duhana, dok je oštećenje DNA u listu bilo značajno manje no statistički različito od kontrole.

(38 stranica, 19 slika, 2 tablica, 38 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Ključne riječi: genotoksičnost / komet-test / talijev(I) acetat / vodikov peroksid / *Nicotiana tabacum*

Voditelj: Prof. dr. sc. Mirjana Pavlica, izvanredni profesor

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

Prof. dr. sc. Ines Radanović

Prof. dr. sc. Dubravka Matoković-Čalogović

Prof. dr. sc. Davor Kovačević

Rad prihvaćen: 1. srpnja 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

DETERMINATION OF THALLIUM(I) ACETATE GENOTOXICITY IN TOBACCO BY COMET ASSAY

Andreja Kupina

Department of Molecular Biology
Faculty of Science, University of Zagreb
Horvatovac 102a, Zagreb

Thallium is a heavy metal whose concentration in the environment has been continuously increasing by industrial activities such as metal ore processing, coal combustion in power plants or cement production. Thereby thallium and its compounds become biologically available and are accumulating in living organisms, plants in particular.

The objective of this research was to determine genotoxicity of thallium(I) acetate in tobacco *Nicotiana tabacum* L. var Xanthi by comet assay, which as a non-specific genotoxicity biomarker quickly and simply shows changes in the DNA molecule, and therefore has a wide-range application in ecotoxicological research and biomonitoring. In order to verify the comet assay sensitivity, hydrogen peroxide was used as a model genotoxicant, *in vitro* conditions showing a direct genotoxic effect on tobacco cell nuclei. Tobacco plants were *in vivo* exposed to different concentrations of thallium(I) acetate for three days. After that period thallium(I) acetate caused mild damage to DNA molecules of tobacco leaves and greater damage to the root. DNA damages grew linearly as the concentration of thallium increased. An acellular comet assay was performed *in vitro* on tobacco leaf nuclei to determine possible mechanisms of thallium effects on DNA. The results were similar to those obtained by a cellular comet assay on tobacco root cells while the DNA damage to the leaf was lower but statistically different from the control sample.

(38 pages, 19 figures, 2 tabels, 38 references, original in Croatian language)

These deposit in Central biological library Rooseveltov trg 6.

Key words: genotoxicity / comet assay / thallium(I) acetate / hydrogen peroxide / *Nicotiana tabacum*

Supervisor: Dr. Mirjana Pavlica, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Dr. Dubravka Matoković-Čalogović, Full. Prof.

Dr. Davor Kovačević, Assoc. Prof..

These accepted: July 1, 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. GENOTOKSIČNOST	2
1.2. TEŠKI METALI	2
1.2.1. TOKSIČNOST TEŠKIH METALA	4
1.3. TALIJ	4
1.3.1. TOKSIČNOST TALIJA	6
1.4. EKOTOKSIKOLOGIJA	8
1.5. BIOMARKERI	9
1.6. KOMET-TEST	11
1.7. CILJ ISTRAŽIVANJA	14
2. MATERIJAL I METODE	15
2.1. POKUSNI ORGANIZAM	15
2.1.1. UZGOJ DUHANA U KULTURI U UVJETIMA <i>in vitro</i>	16
2.2. IZLAGANJE DUHANA TALIJEVOM(I) ACETATU U UVJETIMA <i>in vivo</i>	17
2.3. KOMET-TEST	18
2.3.1. IZLAGANJE DUHANA TALIJEVOM(I) ACETATU U UVJETIMA <i>in vitro</i>	21
2.3.2. IZLAGANJE DUHANA VODIKOVOM PEROKSIDU U UVJETIMA <i>in vitro</i>	22
2.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	23
3. REZULTATI	24
3.1. IZLAGANJE DUHANA TALIJEVOM(I) ACETATU U UVJETIMA <i>in vivo</i>	24
3.2. IZLAGANJE JEZGRI DUHANA U UVJETIMA <i>in vitro</i>	27
4. RASPRAVA	30
5. ZAKLJUČAK	34
6. LITERATURA	35

POPIS KRATICA I SIMBOLA

DDT	1,1,1-triklor-2,2-bis(p-klorfenil)etan
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EtBr	etidijev bromid
EDTA	etilendinitrotetraoctena kiselina
HCl	klorovodična kiselina
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HNO ₃	nitratna kiselina
KOH	kalijev hidroksid
LMP	agaroza niskog tališta
KOH	kalijev hidroksid
NaCl	natrijev klorid
NaOH	natrijev hidroksid
NMP	agaroza normalnog tališta
OH ⁻	hidroksidni ion
PBS	fosfatni pufer
RNA	ribonukleinska kiselina
TRIS-HCl	Tris (hidroksimetil)-aminometan hidroklorid
TBT	tributil-kositar
TIOH	talijev(I) hidroksid
USEPA	U. S. Enviromental Protection Agency (Agencije za zaštitu okoliša)

1. UVOD

U 20. i 21. stoljeću razvojem poljoprivrede, industrije i tehnologije, te povećanjem ljudske populacije javlja se svijest o međusobnoj ovisnosti i povezanosti čovjeka i njegova okoliša. S tom sviješću dolazi spoznaja o utjecaju različitih tvari na organizme u okolišu, te indirektno i na zdravlje ljudi.

Čovjek kao inteligentno, racionalno i kulturno biće kojeg stalno vodi težnja za novim znanjima nastoji zaštititi svoju okolinu i bližnje te osigurati bolju budućnost za sve. Nažalost, kroz povijest se može uočiti puno pogrešaka u procjeni štetnosti nekih tvari. Upotrebom raznih pesticida, insekticida poput DDT-a, TBT-a, lakih i teških metala te raznih kemikalija u prehrambenoj industriji i medicini (npr. Talidomid) otkriven je njihov teratogeni, mutageni, kancerogeni učinak na organizme. Također treba imati na umu da se kemikalije osim u okolišu akumuliraju i u živim organizmima te da niti jedna «karika» biosfere nije zaštićena od njihovih negativnih posljedica.

Stoga, čovjek danas uči iz vlastitih pogrešaka i iskustava, te stalno radi na razvoju različitih metoda i testova koji mogu brzo i precizno odrediti te pravovremeno spriječiti štetno djelovanje neke tvari. Razvojem preciznijih aparatura te temeljem novih spoznaja u biologiji taj se napredak sve brže ostvaruje.

Međutim, niti jedna metoda nije sveobuhvatna, zbog čega veliku ulogu ima uvođenje novih eksperimenata i metoda, koje bi mogle proširiti današnje znanstvene spoznaje.

1.1. GENOTOKSIČNOST

Genotoksičnost neke tvari očituje se u promjeni nasljedne tvari organizma na koji djeluje.

Te promjene se mogu vidjeti kao:

- oštećenja molekule DNA
- genske mutacije
- kromosomske mutacije
- nepravilnosti tijekom mitoze i mejoze ([http 1](#))

Genotoksične tvari su ksenobiotici koji svojim mutagenim i kancerogenim djelovanjem uzrokuju promjene u genomu koje mogu imati negativne posljedice za normalno funkcioniranje i reprodukciju organizma. Promjene u molekuli DNA koje takvi ksenobiotici uzrokuju mogu biti razni jednostruki i dvostruki lomovi lanaca, depurinacija, adukti te unakrsne veze DNA-DNA i DNA-proteini (Steinert i sur. 1998). Ukoliko se ne poprave, nastala oštećenja molekule DNA mogu uzrokovati niz posljedica na razini stanice, organa, jedinke te na kraju i cijele populacije (Lee i Steinert 2003).

Mutacije koje pogađaju germinativne stanice, uvijek se mogu prenijeti na potomstvo, a time se može značajno ugroziti vijabilnost i fertilnost populacije. Oštećenja nasljednog materijala često su uzrok opće slabosti organizma pa ona mogu dovesti do promjena čiji su simptomi objedinjeni pod nazivom «sindrom genotoksičnih bolesti», a obuhvaćaju: promjene u metabolizmu, poremećenu funkciju enzima, degenerativne procese koji prate atrofiju tkiva i organa, inhibiciju rasta, brže starenje, smanjenu mogućnost razmnožavanja, povećanu učestalost neoplazija i bolesti (Kurelec 1993).

Da bi se utvrdilo genotoksično djelovanje neke tvari na stanice, postoji široki spektar testova koji se primjenjuju za detekciju oštećenja u izloženim organizmima. Najpoznatiji su alkalna elucija, alkalno odmatanje, komet-test, kromosomske aberacije, mikronukleus-test i izmjena sestrinskih kromatida ([http 1](#)).

1.2. TEŠKI METALI

Jedna od praktičnih podjela metala jest podjela prema gustoći. Laki su metali oni kojih je gustoća manja od 5 g/cm^3 , kako što su aluminij, magnezij, kalcij. Teški metali, kako što su

npr. olovo, željezo, cink, bakar, živa, zlato imaju gustoću veću od 5 g/cm^3 (Habuš i sur. 1998). Teški metali čine skupinu od preko 60 elemenata (Slika 1) među kojima je većina neesencijalnih (talij, kadmij, živa, krom, olovo) te su neki od njih u malim koncentracijama vrlo toksični.

Porijeklo teških metala u tlu može biti prirodno ili geogeno (npr. vulkanske erupcije), sekundarno pod utjecajem atmosfere, te antropogeno, kao posljedica čovjekovog djelovanja. Najvažniji antropogeni izvori onečišćenja su rudarenje, industrijska proizvodnja, izgaranje fosilnih goriva, recikliranje baterija, komunalni i industrijski otpad, poljoprivreda i medicina (Babić 2007). Tako se npr. uporabom pesticida i trošenjem automobilskih guma povisuje koncentracija kadmija, izgaranjem ugljena oslobađaju se arsen, živa, selen i talij, a komunalnim otpadom uz arsen oslobađaju se još i krom, bakar te nikal (Mallick i Rai 2002).

Teški metali imaju svojstvo da se akumuliraju u živim organizmima, posebno biljkama koje svoje hranjive tvari crpe iz tla u kojem rastu, a koje često može biti kontaminirano toksičnim tvarima. Tako npr. visoke koncentracije teških metala izazivaju brojne anatomske, morfološke i fiziološke promjene u biljkama te utječu na metabolizam biljnih hormona i preko njih na diobu i rast stanica tj. na ukupan rast organizma (<http> 2).

Teški metali također u organizmima ometaju ili sprečavaju velik broj enzimskih reakcija, i to tako što konkuriraju važnim elementima u tragovima i istiskuju ih iz njihovih spojeva.

Čovjek je okružen metalima i polumetalima od postanka zemlje. Oni prolaze biokemijski ciklus s različitim vremenom zadržavanja u atmosferi; hidrosferi, litosferi i biosferi. Dok se u atmosferi zadržavaju najčešće nekoliko dana do nekoliko tjedana, u kopnenim vodama zadržavaju se mjesecima i godinama, u oceanima tisućama godina, a u morskim sedimentima 10^8 godina (Habuš i sur. 1998).

Group IA																VIII															
1																2															
3																4															
Li Be																B C N O F Ne															
11 12																13 14 15 16 17 18															
Na Mg																Al Si P S Cl Ar															
19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30																31 32 33 34 35 36															
K Ca Sc Ti V Cr Mn Fe Co Ni Cu Zn																Ga Ge As Se Br Kr															
37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48																49 50 51 52 53 54															
Rb Sr Y Zr Nb Mo Tc Ru Rh Pd Ag Cd																In Sn Sb Te I Xe															
55 56 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80																81 82 83 84 85 86															
Cs Ba Lu Hf Ta W Re Os Ir Pt Au Hg																Tl Pb Bi Po At Rn															
87 88 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112																															
Fr Ra Lr Unq Unp Unh Uns Uno Une Uun Uuu Uub																															
Lanthanide Series																57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70															
La Ce Pr Nd Pm Sm Eu Gd Tb Dy Ho Er Tm Yb																															
Actinide Series																89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102															
Ac Th Pa U Np Pu Am Cm Bk Cf Es Fm Md No																															

Slika 1. Periodni sustav elemenata.

1.2.1. TOKSIČNOST TEŠKIH METALA

Toksičnost teških metala temelji se na direktnim i indirektnim oštećenjima struktura i procesa bitnih za normalno funkcioniranje stanice.

Direktna oštećenja izazvana su vezanjem metala na funkcionalne skupine, zamjenom esencijalnih iona toksičnim metalima i promjenom aktivne konformacije biološki važnih molekula. Indirektna oštećenja obuhvaćaju oštećenja nastala uslijed sekundarnog stresa (npr. oksidacijskog) koji nastupa kada koncentracija nastalih toksičnih spojeva nadmaši obrambeni kapacitet stanice pri čemu se u većoj ili manjoj mjeri oštećuju biološki važne molekule kao što su DNA, RNA, proteini, pigmenti i lipidi (Perl-Treves i Perl 2002, Mallick 2004).

1.3. TALIJ

Talij (lat. *Thallium*) je kemijski element simbola Tl koji pripada skupini teških metala. U periodnom sustavu nalazi se u 6. periodi i 13. grupi elemenata. Atomski broj mu iznosi 81, a relativna molekulska masa 204,3833 g/mol. Gustoća talija je 11,83 g/cm³ (Tremel i sur. 1997). U prirodi se javlja u obliku dva izotopa: oko 30% ukupnog talija čini ²⁰³Tl (202,97 g/mol), dok preostalih 70% čini ²⁰⁵Tl (204,97 g/mol). Poznato je i 26 umjetnih izotopa molekulskih masa u rasponu od 191 do 210 g/mol (Frattini 2005). Elektronska konfiguracija vanjske ljuske talija (4f¹⁴5d¹⁰6s²6p¹) dozvoljava dva oksidacijska stanja: Tl⁺ i Tl⁺³ (Babić 2007). Jednovalentni talij je manje toksičan i sliči kalijevom ionu K⁺. Trovalentni talij je izuzetno toksičan, i nastaje zagrijavanjem jednovalentnog talija ili tretiranjem istoga koncentriranom nitratnom kiselinom (Emsley 2003).

Talij je mekan, srebrno-bijeli metal koji se može rezati nožem (Slika 2 B). Nepostojan je na zraku jer brzo oksidira i sa vlagom iz zraka formira hidroksid (TlOH), te se zbog toga čuva u petroleju. Topiv je u svim kiselinama, a izrazito u nitratnoj kiselini (Emsley 2003).

Talij je 1869. godine slučajno otkrio Sir William Crookes (1832-1919) (Slika 2 A). Pri spaljivanju otpada iz pogona za proizvodnju sulfatne kiseline u spektru je primijetio zelenu liniju koja je pripadala do tada nepoznatom elementu. Zbog zelene boje spektra novome je elementu dao naziv talij (grč. Thallos – zeleni pupoljak). Tijekom slijedećih godina element je okarakteriziran i 1873. uvršten u periodni sustav elemenata.

Talij je sastavni dio sulfidnih ruda cinka, olova, željeza i bakra (Kazantzis 2000). Naročito bogate talijem su «kuroko» (Cu_7TlSe_4) polimetalne sulfidne rude vulkanskog podrijetla nastale hidrotermalnom mineralizacijom, a ima ga dosta u granitu te ugljenu iz perioda jure (Xiao i sur. 2004). Široko je rasprostranjen, ali u vrlo niskim koncentracijama.

Prosječna koncentracija talija u Zemljinoj kori iznosi od 0,013 do 0,6 ppm (Emsley 2003) (Tablica 1), u prirodnim neonečišćenim vodama do 0,03 ppm (Mulkey i Oheme 1993), dok u onečišćenim vodama u blizini rudnika dostiže i 96 ppm (Zhou i Liu 1985).



Slika 2. Engleski kemičar William Crookes (A). Talij (B).

Tablica 1. Količina talija u okolišu (Emsley 2003).

Talij u okolišu	
Zemljina kora	0,6 ppm
Tlo	02-2,8 ppm
Morska voda	10 ppt
Atmosfera	-

Postoji nekoliko geoloških područja prirodno bogatih talijem koncentracije i do 100 ppm u tlu. Najpoznatija su područja Alšar u Makedoniji, Rotokawa u Novom Zelandu, Lengebach u Švicarskoj, Guizhoz u Kini te područje Neisse na tromedi Njemačke, Poljske i Češke (Heim 2002, Xiao i sur. 2004).

Svjetska proizvodnja talijevih spojeva iznosi oko 30 tona godišnje, a od toga se samo mali dio elektrokemijski prerađuje u čisti talij (Emsley 2003). Najveći izvor onečišćenja su cementare i elektrane koje energiju dobivaju sagorijevanjem ugljena (Babić 2007). Talij se također pojavljuje kao nusproizvod tijekom taljenja metalnih ruda cinka i olova, te se oslobađa i prilikom obrade sulfidnih ruda (npr. pirit) za proizvodnju sumporne kiseline (Emsley 2003).

Svjetska zdravstvena organizacija je već 1973. predložila zabranu uporabe talija, no on se još uvijek koristi kao rodenticid, insekticid, pigment, impregnacijsko sredstvo, sredstvo za razdvajanje rudača i proizvodnju pirotehničkih sredstava zelene boje te u medicini. Prije se talij koristio u liječenju sifilisa, gonoreje, tuberkuloze, lišaja i drugih kožnih infekcija te kao depilacijsko sredstvo (Cvjetko 2009). Danas se u medicini talij koristi kao radioaktivni izotop ^{201}Tl da bi se dijagnosticirale bolesti srca (Emsley 2003). Također je sve češća njegov upotreba u visokotehnološkim procesima kao što su proizvodnja poluvodiča, niskotemperaturnih termometara, optičkih kablova u telekomunikaciji. (Galvan-Arzate i Santamaria 1998, Kazantzis 2000, John Peter i Viraraghavan 2005). U malim količinama talijeve soli se stavljaju u balon žarulja sa žarnom niti gdje kod gorenja uklanjaju i posljednje ostatke kisika i na taj način produžuju radni vijek žarulja (<http> 3).

Talij nema biološku ulogu u ljudima, životinjama, biljkama niti mikroorganizmima stoga im nije potreban niti u jednoj fazi razvoja.

1.3.1. TOKSIČNOST TALIJA

Talij se iz okoliša može apsorbirati pomoću biljaka (Wallwork-Barber i sur. 1985) pa ugradnjom u hranidbene lance postaje dostupan višim organizmima uključujući i čovjeka. Istraživanja su pokazala da je talij iz antropogenih izvora dostupniji biljkama nego talij iz prirodnih izvora (Wierzbicka i sur. 2004). Procijenjeno je da prosječni dnevni unos talija putem povrća u ljudski organizam u SAD-u iznosi oko 7 μg . Talij se s vremenom akumulira u organizmu (Tablica 2), a najveće koncentracije nalaze se u bubrezima i jetri (Emsley 2003). Prema standardima Agencije za zaštitu okoliša (USEPA) preporučeni maksimalni unos ne bi

smio iznositi više od 5 µg mada se i 14 µg smatra prihvatljivim. Pri povećanom unosu (već oko 20 µg) kroz dulji period dolazi do simptoma kronične talotoksikoze (Lin i sur. 2001).

Poznato je da talij u animalni organizam ulazi preko kože i sluznice, te ingestijom ili inhalacijom (Cvjetko 2009). U čovjeka se simptomi trovanja talijem pojavljuje otprilike 2 tjedna nakon izloženosti. To su tromost, kratkotrajna nesvjestica, usporen govor, opća slabost i gubitak kose. Kako se talij može apsorbirati direktno kroz kožu, treba paziti kako se njime rukuje jer može uzrokovati otpadanje noktiju (Emsley 2003). Blaže oblike trovanja talijem moguće je tretirati aktivnim ugljenom i kalij cijanoferatom (John Peter i Viaraghavan 2005). Letalna doza talija za čovjeka iznosi 8 mg/kg (Babić 2007).

Tablica 2. Prosječna količina talija u ljudskom tijelu (Emsley 2003).

Talij u ljudskom tijelu	
Krv	0,5 ppb
Kosti	2 ppb
Tkivo	4-70 ppb (većina u mišićnom tkivu)
Ukupan iznos Tl u tijelu	otprilike 0,5 mg

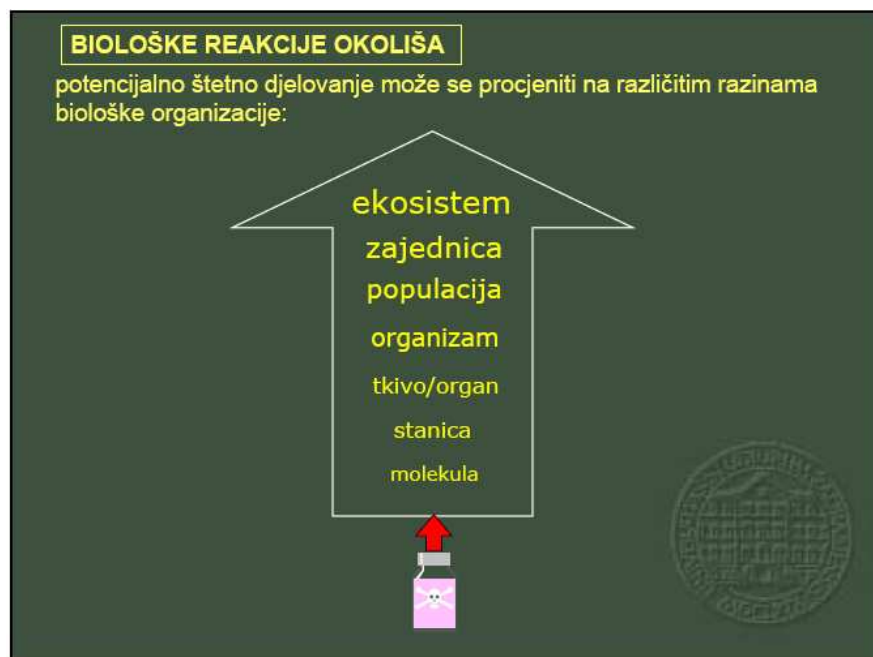
USEPA uvrštava talij među 13 najtoksičnijih metala (Scheckel i sur 2004). Razlog visoke toksičnosti talija leži u njegovom visokom afinitetu prema amino-, imino- i sulfhidrilnim skupinama enzima te kemijskoj sličnosti kalija. Zbog sličnog ionskog radijusa stanična membrana ne razlikuje ione talija (Tl^+ ; ionski radijus 147 pm) od iona kalija (K^+ ; ionski radijus 133 pm; Hoffman i sur. 1999) te oni imaju isti mehanizam prijenosa u stanicu. Osim što interferira s ulaskom kalija u stanicu talij utječe i na metaboličke procese oponašajući kalij. Dokazano je da sudjeluje u aktivaciji nekih enzima (Na^+/K^+ -ATP-aze, piruvat kinaze i aldehid dehidrogenaze), u stabilizaciji ribosoma i kontrakciji mišića te da utječe na sintezu proteina, transportne mehanizme i mitozu (Galvan-Arzate i Santamaria 1998, Wierzbicka i sur. 2004, John Peter i Viraraghavan 2005).

Nažalost ova svojstva talija doprinijela su i njegovoj zlouporabi. Kako talijeve soli nemaju boju, okus niti miris, često je korišten kao otrov da bi se uklonili politički protivnici te je opće poznato da je Sadam Husein talijem trovao svoje protivnike (Babić 2007).

Također su poznati i primjeri slučajnih situacija trovanja talijem. Tako se 1987. u Gvajani dogodio incident u kojem je na stotine ljudi pokazivalo simptome trovanja talijem, a 44 ih je umrlo. Njihova smrt bila je posljedica konzumacije mlijeka krava koje su se hranile melasom zatrovanom talijevim sulfatom koja se koristila kao rodenticid (Emsley 2003).

1.4. EKOTOKSIKOLOGIJA

Utjecaj toksičnih tvari u ekosistemima, ne zadržava se samo na jednoj razini, već se kruženjem tvari toksini šire na sve razine biološke organizacije (Slika 3). Zbog toga se razvila potreba za znanošću koja će proučavati utjecaj ksenobiotika na razini ekosistema. To je sintetička znanost koja povezuje mnoge biološke i geografske razine (toksikologija, kemija, ekologija, molekularna biologija, fiziologija).



Slika 3. Redoslijed promjena po razinama biološke organizacije (<http> 1).

Dakle, ekotoksikologiju definiramo kao «granu toksikologije» koja se bavi istraživanjem toksičnih učinaka onečišćivača prirodnog i antropogenog porijekla na sastavnice ekosistema (biljke, životinje, mikroorganizme) odnosno ekosistem u cjelini ([http 1](#)).

Tri glavna cilja ekotoksikologije su:

1. prikupljanje dovoljne količine podataka za procjenu okolišnog rizika i upravljanje okolišem
2. zadovoljenje zakonskih uvjeta za razvoj novih kemijskih spojeva i određivanje njihovih dozvoljenih koncentracija u okolišu
3. razvoj empirijskih ili teorijskih principa (paradigmi) za poboljšanje znanja o ponašanju i učinku kemikalija u živim sustavima ([http 1](#))

1.5. BIOMARKERI

Izloženost ksenobioticima i ostalim toksičnim tvarima te njihov učinak na živi organizam može se mjeriti biomarkerima. Biomarkeri su mjerljivi signali fizioloških, biokemijskih i histoloških promjena u staničnim i biokemijskim procesima, strukturama i funkcijama biološkog sustava koji nastaju djelovanjem ksenobiotika ([http 1](#)).

Biomarkeri se mogu podijeliti na:

- biomarkeri učinka – upućuju na to da je izloženost organizma oštećenju uzrokovala određen negativan učinak (oštećenje)
- biomarkeri izloženosti – upućuju na izloženost organizma, populacije ili zajednice onečišćenju, ali ne daju informacije o stupnju negativnih učinaka koje je ta promjena izazvala

Biomarkere na staničnoj i molekularnoj razini dijelimo na:

1. Specifične – pokazuju reakcije organizama na određene grupe zagađivala (npr. teški metali). Ovoj skupini pripadaju:
 - metalotioneini - topivi, termostabilni proteini male molekularne težine koji imaju veliki afinitet prema kationima teških metala
 - sustav oksidaza miješanih funkcija – lipofilne organske tvari (PAH)
 - inhibicija delta aminolevulinat dehidraze – olovo
 - inhibicija acetilkolinesteraze (AChE)- organofosfati i karbamati

2. Općeniti ili manje specifični – pokazuju nespecifičnu reakciju organizma na različite okolišne utjecaje koji uključuju zagađivače te prirodne fizikalne i biološke čimbenike (npr. promjene u temperaturi ili salinitetu, koncentraciji kisika, prisutnosti hrane i dr.).

Ovoj skupini pripadaju:

1. promjene u fenotipu
2. imunološke promjene
3. histopatološke promjene
4. mehanizam multiksenobiotične otpornosti
5. promjene u radu endokrinog sustava
6. produkcija stres proteina
7. molekularno-citogenetičke promjene – oštećenja DNA (kromosomske aberacije, komet-test, mikronukleus-test)

Kriteriji koje bi trebao zadovoljiti dobar biomarker:

1. analiza/mjerenje mora biti pouzdano i što jednostavnije
2. prirodna razina/aktivnost biomarkera treba biti poznata kako bi se moglo razlučiti koje su promjene izazvane onečišćivačem u odnosu na normalne/prirodne varijabilnosti
3. treba dobro poznavati biologiju/fiziologiju proučavanog organizma kako bi se minimalizirali izvori prirodnih varijacija- rast i razvoj, reprodukcija, vrsta hrane
4. trebali bi biti poznati svi vanjski i unutrašnji faktori koji utječu na dobivene vrijednosti biomarkera
5. ne zahtjeva žrtvovanje proučavanih jedinki ([http 1](http://1))

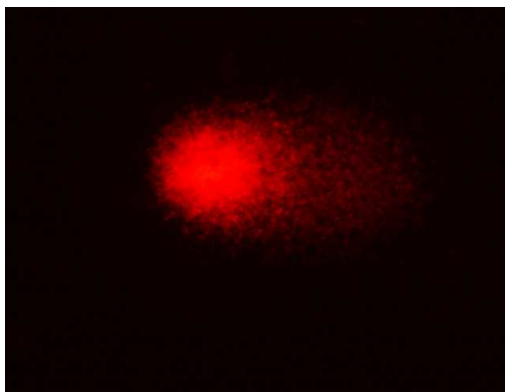
Da bi se utvrdila prisutnost biomarkera te da bi ih se vizualiziralo, primjenjuju se brojne citogenetičke metode, koje daju materijalne dokaze za određene promjene u okolišu (Sertić 2005).

U ovom diplomskom radu napravljena je analiza genotoksičnosti talija komet–testom koji kao nespecifičan biomarker genotoksičnosti vrlo dobro pokazuje stupanj oštećenja molekule DNA.

1.6. KOMET-TEST

Komet test (eng. *single cell gel electrophoresis assay*) je mikrogel elektroforeza jezgara u kojoj DNA, ukoliko su prisutni lomovi, migrira prema anodi. Naziv ove metode potječe od izgleda jezgre s oštećenom DNA koja nalikuje svemirskom tijelu kometu (Slika 4).

Rydberg i Johanson su prvi koji su razvili metodu mjerenja količine oštećene molekule DNA u pojedinačnim stanicama. Stanice su bile lizirane u blago lužnatim uvjetima da bi se ostvarilo djelomično odmatanje DNA molekule u agaroznom gelu, te je nakon bojanja molekule DNA bilo moguće detektirati jednolančane i dvolančane lomove (Rojas i sur. 1999). Östling i Johnson (1984) su otišli korak dalje u razvoju ove metode, a to je bio dodatak elektroforeze u uvjetima neutralnog pH nakon liziranja stanica. To je omogućilo detekciju dvolančanih lomova (Rojas i sur. 1999). Singh i sur. (1988) su razvili alkalnu verziju ($\text{pH} > 13$) komet-testa koja omogućuje detekciju jednolančanih lomova, kakva se uz manje preinake izvodi i danas (Rojas i sur. 1999).



Slika 4. Jezgra stanice duhana *Nicotiana tabacum* L. vidljiva fluorescencijskim mikroskopom kod povećanja 400x, nakon komet-testa.

Ovisno o pH vrijednosti pri kojoj se izvodi komet-test, ovom metodom se mogu detektirati :

- alkalno-labilna mjesta
- jednolančani i dvolančani lomovi
- mjesta sa zakašnjelim popravkom DNA
- oksidativna oštećenja baza
- unakrsne veze između DNA i DNA te DNA i proteina

U puferima neutralne pH vrijednosti (7-8) moguće je detektirati samo dvolančane lomove, ukoliko je vrijednost pH 12,1 uočljivi postaju jednolančani lomovi DNA i mjesta zakašnjelog popravka DNA. Pri pH većem od 13 ovom metodom se mogu detektirati alkalno-labilna mjesta, jednolančani lomovi i mjesta zakašnjelog popravka DNA ([http 1](http://1)).

Ovisno o cilju istraživanja te korištenju animalnog ili biljnog testnog organizma, razlikuje se nekoliko izvedbi komet-testa. Sve izvedbe imaju isto načelo i odvijaju se slijedećim redoslijedom:

1. uzgoj i izolacija stanica
2. ulaganje stanica u agarozni gel
3. liziranje stanica upotrebom detergenata i visoke koncentracije soli (time se uklanjaju stanični proteini što omogućava pokretljivost DNA fragmenata)
4. denaturacija DNA u alkalnim uvjetima
5. elektroforeza u neutralnom, blago alkalnim ili visoko alkalnim uvjetima
6. neutralizacija
7. bojanje jezgara fluorescencijskom bojom
8. mjerenje oštećenja pomoću fluorescencijskog mikroskopa i računalnog programa za analizu oštećenja DNA u pojedinačnim jezgrama

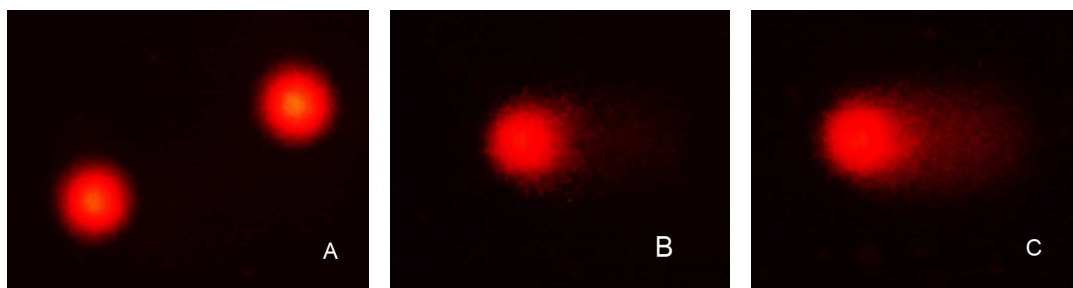
Nakon liziranja i denaturacije u alkalnim uvjetima, oštećeni dijelovi DNA molekule se otpuštaju iz jezgre i tijekom elektroforeze putuju kroz električno polje prema pozitivno nabijenoj anodi. Jezgre pri tome gube svoj cjelovit oblik i prelaze u strukture nalik kometu koje se sastoje od «glave» i «repa». Sposobnost migriranja DNA fragmenata iz središta jezgre u rep kometa, ovisi o veličini DNA fragmenata te o broju njezinih isprekidanih krajeva. Povećanjem broja lomova, fragmenti DNA sve slobodnije migriraju u rep kometa pa se on povećava razmjerno s oštećenjem molekule DNA (Sertić 2005). Na taj način mogu detektirati različite razine oštećenja molekule DNA nastale kao posljedica djelovanja genotoksikanta (Slika 5).

Oštećenje DNA procjenjuje se na osnovu mjerenja «repa» i «glave» kometa.

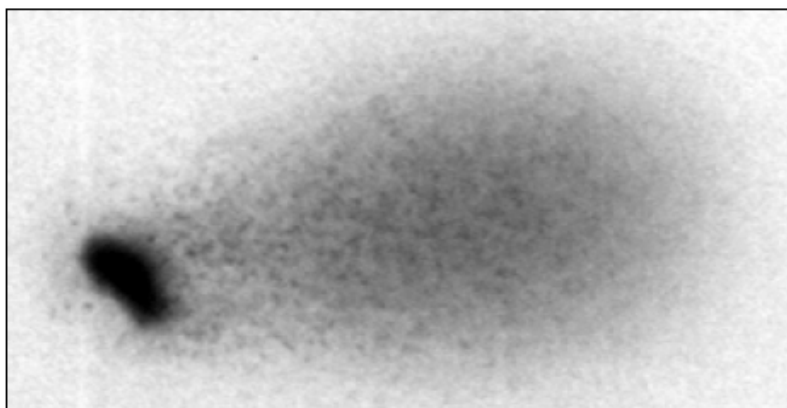
Osnovni parametri koji definiraju komet su:

1. dužina repa - udaljenost na koju su tijekom elektroforeze otputovali fragmenti DNA
2. postotak DNA u repu
3. repni moment - dužina repa x postotak DNA u repu

Također komet-testom se mogu detektirati stanice u apoptozi (programirana stanična smrt uzrokovana brojnim fiziološkim i fizičkim mehanizmima) koja se javlja kao posljedica visokog stupnja oštećenja ili kod umirućih stanica. U tom su slučaju glava i rep kometa potpuno odvojeni ili je jezgra raspršena (Slika 6).



Slika 5. Različite razine oštećenja molekule DNA u jezgrama duhana nakon komet-testa. Kontrolne jezgre (A). Jezgra stanice duhana izložena niskoj koncentraciji genotoksikanta (B). Jezgra stanice duhana izložena visokoj koncentraciji genotoksikanta (C).



Slika 6. Izgled jezgre u apoptozi nakon komet-testa; ; tzv. “hedgehog” (jež) komet – “mala glava, veliki rep” ([http 1](http://1)).

Komet-test ima mnoge prednosti pred ostalim citogenetičkim metodama za detekciju oštećene DNA molekule i zbog toga je našao široku primjenu u genetičkoj toksikologiji te ekogenotoksikologiji (Pavlica i sur. 2001).

Prednosti komet-testa:

- ne zahtijeva mitotički aktivne stanice niti malobrojne i velike kromosome
- primjenljiv na bilo koji tip eukariotskih stanica
- malen broj stanica potreban za provođenje testa
- otkriva oštećenje u pojedinačnim stanicama (http 1)
- visoka osjetljivost s mogućnošću detekcije 1 loma na 10^{10} Da (Gedik i sur. 1992).

1.7. CILJ ISTRAŽIVANJA

Istraživanja onečišćenja okoliša do nedavno su se temeljila na mjerenju fizikalno-kemijskih parametara. Takva istraživanja nisu davala idealne rezultate jer nisu uključivala biološku komponentu okoliša. Toksini imaju različite učinke na organizme jer kroz hranidbene lance imaju mogućnost bioakumulacije i biotransformacije. Posebno se tu ističu biljke koje su ili namjerno (pesticidi i regulatori rasta) ili slučajno (mješavine zagađivala koje djeluju na biljke kroz vodu, tlo i zrak) izložene djelovanju ksenobiotika. Stoga se razvila potreba za metodama koje će pravovremeno utvrditi promjene u ekosistemu uzrokovane ksenobioticima. Jedna od takvih metoda je komet-test koji se često primjenjuje u okolišnom biomonitoringu jer pokazuje promjene genetičkog materijala organizama te nam služi kao dobar indikator o stanju promatranog ekosistema i daje procjenu ugroženosti okoliša.

Cilj ovog istraživanje bio je ispitati primjenjivost celularnog komet-testa kao nespecifičnog biomarkera genotoksičnosti izlaganjem biljke *Nicotiana tabacum* L. različitim koncentracijama teškog metala talijeva(I) acetata. Na taj način se nastojalo utvrditi na koji način talij oštećuje molekulu DNA (indirektno ili direktno) u stanicama korijena i lista. Učinak talijeva(I) acetata mjeren je i acelularnim komet-testom na jezgrama stanica lista duhana radi utvrđivanja eventualnog direktnog djelovanja talija na DNA.

2. MATERI JAL I METODE

2.1. POKUSNI ORGANIZAM

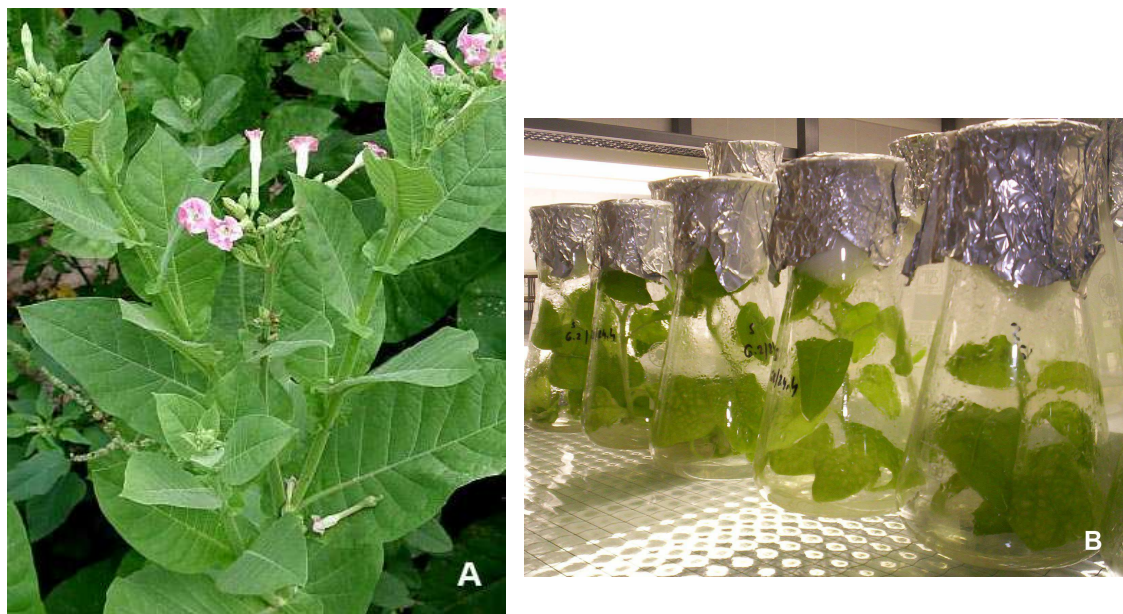
U istraživanju genotoksičnog učinka talijeva(I) acetata kao pokusni organizam koristio se duhan *Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi genotipa a_1^+ / a_1^- ; a_2^+ / a_2^- . Taj varijetet je svijetlo zelene boje, dok je dominantni genotip te vrste tamnozeleno boje (Slika 7). Svjetlozeleni dvostruki heterozigot se koristi u istraživanjima oštećenje molekule DNA jer se na njemu mogu bolje uočiti somatske mutacije koje uzrokuju promjene u boji i strukturi listova (Gichner i sur. 2004).



Slika 7. Lijevo: Divlji tamno-zeleni tip duhana. Desno: *N. tabacum* var. Xanthi (Gichner i sur. 2004).

Duhan pripada porodici *Solanaceae*. Većinom su to jednogodišnje biljke visoke i preko 2 m. Imaju velike nerazdijeljene listove duge do 70 cm, a cvjetovi na vrhu stabljike prave štitasti cvat. Plod je tobolac s velikim brojem sitnih sjemenaka. Domovina mu je u suptropskim krajevima Amerike, a neke samonikle vrste nalaze se i na Sudanskim otocima, u Australiji i otocima Tihog oceana. Neke se vrste uzgajaju kao ukrasno bilje, a najvažnije su dvije komercijalne vrste *N. tabacum*, pravi duhan i *N. rustica*, seoski duhan. Dozrijeli listovi tih dvaju vrsta i njihovih varijeteta se suše, fermentiraju i tako pripremljeni se upotrebljavaju za pušenje i žvakanje. 1519. godine duhan je prenesen iz Amerike u Portugal, a ostatkom Europe

se počeo širiti poslije 1560. Danas se duhan uzgaja u raznim kvalitetama gotovo u svim krajevima umjerenog i suptropskog pojasa (Slika 8 A).



Slika 8. *Nicotiana tabacum* L. Poljoprivredni uzgoj duhana (A). Uzgoj duhana u laboratoriju (B).

2.1.1. UZGOJ DUHANA U KULTURI U UVJETIMA *in vitro*

Biljnu kulturu duhana *Nicotiana tabacum* var. Xanthi dobila sam tako što sam u Erlenmeyerove tikvice sa modificiranom hranjivom podlogom po Murashige i Skoogu (Murashige i Skoog 1962) (Babić 2007) (Tablica 3) stavila po jednu sjemenku duhana te tikvice začepila vatom i aluminijskom folijom. Vrijednost pH hranjive podloge podešavala sam sa 0,1 M otopinom kalijeva hidroksida (KOH) do iznosa 5,6. Nakon mjesec dana rasta u uvjetima dugog dana (16 h svjetla i 8 h tame) na temperaturi 24 ± 1 °C te uz rasvjetu fluorescentnih cijevi ($90 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$) (Slika 8 B), od pojedine matične biljke odvojila sam po nekoliko nodija sa listom i svaki nasadila u novu Erlenmeyerovu tikvicu sa hranjivom podlogom po Murashige i Skoogu. Postupak nasađivanja biljaka iz sjemenki i presađivanje u nove tikvice izvodila sam u laminaru koristeći pribor, Erlenmeyerove tikvice te podloge prethodno sterilizirane u autoklavu na 121 °C, 15 Mpa kroz 18 min. Na taj način cijelu

kulturu su činili klonovi biljke *Nicotiana tabacum* var. Xanthi koji su držani u istim uvjetima u kojima su rasle i matične biljke iz sjemenki.

Tablica 3. Sastav modificirane hranidbene podloge po Murashige i Skoogu.

MAKROLELEMENTI	mg L ⁻¹	mmol dm ⁻³
KNO ₃	1900	18,80
NH ₄ NO ₃	1650	20,60
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	2,99
KH ₂ PO ₄	170	1,25
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370	1,5
MIKROELEMENTI	mg L ⁻¹	mmol dm ⁻³
H ₃ BO ₃	6,2	100,0
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025	0,1
KI	0,83	5,0
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	1,0
CuSO ₂ x 5H ₂ O	0,025	0,1
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3	100,0
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6	29,9
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8	100,0
Na ₂ EDTA	37,3	100,0
ORGANSKI DODACI		
m-inozitol	50	277,5
Tiamin-HCl	0,05	0,15
Saharoza	6000	11,3
MES-kalijeva sol	200	3,77
Fitagel	880	-

2.2. IZLAGANJE DUHANA TALIJEVOM(I) ACETATU U UVJETIMA *in vivo*

Biljke duhana koje sam uzgojila u uvjetima *in vitro*, nakon 30 dana su dosegle optimalan razvoj tako što su se razvili veliki listovi i dovoljna količina korijenja. Te biljke sam izložila

otopini talijeva(I) acetata u uvjetima *in vivo*. Uzela sam 14 biljaka te ih pažljivo premjestila iz Erlenmeyerovih tikvica u sterilne plastične čaše s prethodno priređenim otopinama različitih koncentracija talijeva(I) acetata u 40 mL destilirane vode. Koncentracije otopine talijeva(I) acetata bile su 2, 4, 20 i 40 μM . Još sam priredila dvije otopine kalijeva acetata: 20 μM talijeva(I) acetat + 40 μM kalijeva acetat te 40 μM kalijeva acetata. Dvije biljke koje sam stavila u 40 mL destilirane vode služile su kao negativna kontrola. Zatim sam biljke u priređenim otopinama vratila u komoru gdje su držane 3 dana u uvjetima dugog dana (16 h svjetla i 8 h tame) na temperaturi od $24 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz rasvjetu fluorescentnih cijevi ($90\text{ }\mu\text{E s}^{-1}\text{ m}^{-2}$).

2.3. KOMET-TEST

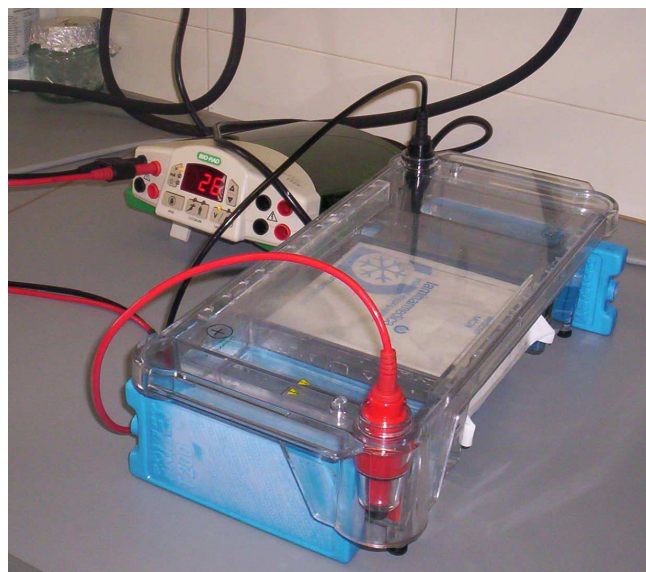
Nakon 3 dana na jezgrama korijena i lista svake pojedine biljke duhana provela sam komet-test po metodi koju su opisali Gichner i sur. (2004) da bi utvrdila prisutnost oštećenja molekule DNA. Prije izolacije jezgara pripremila sam djelomično brušena predmetna stakalca (ESCO, Erie Scientific) s prvim slojem agaroze tako da sam stakalca uranjala u vodenu otopinu 1%-tne agaroze NMP. Nakon toga sam pričekala oko 15 min dok se agarozu polimerizira. Cijeli postupak izolacije jezgara radila sam na ledu da bi se smanjila mogućnost oštećenja DNA. S lista biljke sam izdvojila komadić veličine $1,5 \times 1,0\text{ cm}$ te prebacila u Petrijevu zdjelicu na ledu u koju sam prethodno stavila 240 μL pufera za izolaciju (Tris-HCl, pH 7,5). Komadić lista sam pomoću žileta mehanički izrezala na tanke trake jer se na taj način oslobađaju jezgre iz stanice (Slika 9). Isti postupak ponovila sam i s korijenom biljke koji sam također mehanički sjeckala pomoću žileta.



Slika 9. Izolacija jezgri iz lista *Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi.

Nakon toga sam nagnula Petrijevu zdjelicu kako bi se što više jezgara nakupilo u puferu te pomoću mikropipete izdvojila 120 μL uzorka i prenijela u Eppendorf tubicu u kojoj sam prethodno pripremila drugi sloj agaroze (100 μL 1%-tne agaroze LMP u fosfatnom puferu PBS, pH vrijednosti 7,0, temperature 42 $^{\circ}\text{C}$). 120 μL suspenzije i drugog sloja agaroze sam ponovo pomoću mikro-pipete izdvojila i prenijela na predmetno stakalce s prvim slojem agaroze te sve poklopila pokrovnim stakalcem. Tako pripremljeni uzorak sam prebacila u kadicu sa ledom na oko 15 min da bi se agarozna što prije polimerizirala i jezgre fiksirale u gelu. Postupak sam ponavljala nekoliko puta jer sam po svakoj koncentraciji izdvajala 150 jezgara iz listova i korijena. Budući da se na predmetna stakalca nanosi ukupno 3 sloja agaroze, u ovom sam slučaju treći sloj NMP agaroze i inkubacija u puferu za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, 1%-tni Triton X-100, 10%-tni DMSO) izostavila jer nemaju učinak na kvalitetu i učinkovitost testa (Babić 2007).

S obzirom da sam izvodila alkalnu verziju komet-testa pufer za elektroforezu je sadržavao 10 mM NaOH, 200 mM EDTA, pH vrijednosti iznad 13. Ohlađeni pufer (4 $^{\circ}\text{C}$) sam ulila u kadicu za elektroforezu (Biorad) te u nju horizontalno posložila predmetna stakalca sa kojih sam prethodno maknula pokrovno stakalce. U puferu za elektroforezu provela sam alkalnu denaturaciju DNA kroz 10 min na +4 $^{\circ}\text{C}$. Elektroforezu u trajanju od 20 min također sam provela u istom puferu i u istim uvjetima pri jakosti struje od 300 mA i 26 V. S obzirom da za vrijeme elektroforeze pod utjecajem struje raste i temperatura pufera, kadicu za elektroforezu sam obložila ledenim oblozima te pomoću njih održavala temperaturu stalnom (Slika 10).

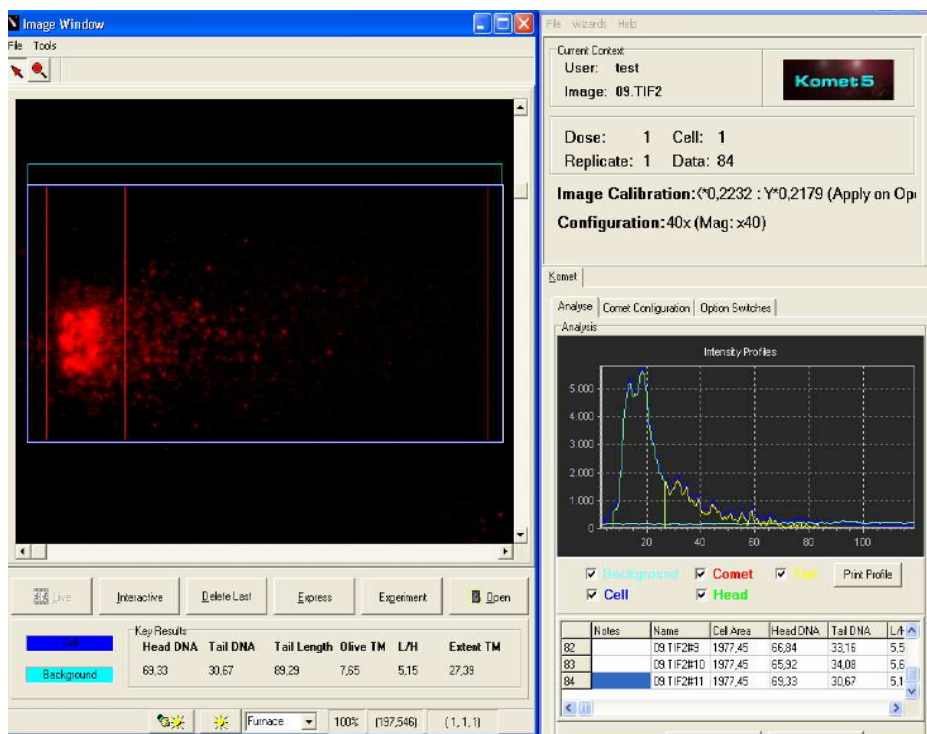


Slika 10. Kadica za elektroforezu sa uzorcima.

Po završetku elektroforeze preparate sam neutralizirala 3 puta po 5 min u Tris-HCl puferu pH vrijednosti 7,5, isprala destiliranom vodom te ostavila da se osuše na sobnoj temperaturi. Tako pripremljeni preparati mogu biti pohranjeni i nekoliko mjeseci u tami na sobnoj temperaturi.

Neposredno prije analize stakalca sam rehidrirala destiliranom vodom (5 min), te bojala nakapavanjem (oko 70 μ l po preparatu) otopine fluorescencijske boje etidijeva bromida u koncentraciji 10 μ g/mL. Suvišak boje isprala sam kratkotrajnim uranjanjem stakalca u destiliranu vodu te ih prekrila pokrovnim stakalcem. Tako pripremljene preparate pregledavala sam fluorescencijskim mikroskopom Zeiss Axioplan (filter 09: ekscitacija kod valne duljine 520 nm, emisija kod valne duljine 610 nm). Jezgre sam snimala digitalnom kamerom kod povećanja objektiva 40x. Za svaku koncentraciju talijeva(I) acetata napravila sam tri preparata te na svakom snimila po 50 jezgara.

Oštećenja u molekuli DNA nastala djelovanjem talijeva(I) acetata analizirala sam računalnim programom Komet (Komet version 5, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Za procjenu oštećenja mjere se dužina repa, postotak DNA u repu i repni moment. Na temelju intenziteta fluorescencije program izračuna postotak DNA u repu. Repni moment izračunat je množenjem dužine repa i postotka DNA u repu (Slika 11).



Slika 11. Analiza jezgara pomoću računalnog programa Komet 5 Kinetic Imaging.

2.3.1. IZLAGANJE DUHANA TALIJEVOM(I) ACETATU U UVJETIMA *in vitro*

Za procjenu direktnog djelovanja talijeva(I) acetata na molekulu DNA duhana napravila sam acelularni komet-test. Jezgre sam izolirala iz listova biljke duhana stare 60 dana te preparate priredila na isti način kao za izvođenje komet-testa, ali tako da sam jezgre prije denaturacije i elektroforeze tretirala različitim koncentracijama otopine talijeva(I) acetata. Priredila sam slijedeće koncentracije talijeva(I) acetata u Tris-HCl-u (pH 7,5): 2, 4, 20, 40 μM te 20 μM otopine talijeva(I) acetata + 40 μM otopine kalijeva acetata i 40 μM otopine kalijeva acetata također u Tris-HCl-u.

Za kontrolnu skupinu upotrijebila sam preparate izložene samo u 50 mL Tris-HCl-a. Uzorke sam držala 2 h u mraku pri temperaturi od 4 °C. Nakon izlaganja preparate sam tri puta ispirala otopinom Tris-HCl-a (pH= 7,5) da bi se neutralizirao visoko bazični pufer u kojem se odvijala elektroforeza. Za svaku koncentraciju napravila sam po tri preparata te na svakome analizirala po 50 jezgara. U daljnjem postupku slijedila sam već opisani protokol za izvođenje komet-testa.

2.3.2. IZLAGANJE DUHANA VODIKOVOM PEROKSIDU U UVJETIMA *in vitro*

Vodikov peroksid je bezbojna tekućina koja se s vodom miješa u svim omjerima, a najčešće se upotrebljava kao otopina masenog udjela od 3 do 30 %. Izrazito je jako oksidacijsko i redukcijsko sredstvo. U vodenim otopinama vodikov peroksid je slaba kiselina koja disocira u 2 stupnja dajući hidrogenperoksidni i peroksidni anion. Zbog male konstante disocijacije peroksid-ion je jaka baza koja reagira s vodom dajući ponovo vodikov peroksid i odgovarajući hidroksid, OH^- (Filipović i Lipanović 1995). Hidroksidni ion je izuzetno reaktivan i odmah reagira s gotovo svim organskim molekulama (Livingstone 2001).

Molekula DNA je naročito osjetljiva na oštećenja uzrokovana reaktivnim oblicima kisika. Hidroksilni radikal može prouzročiti modifikaciju te destrukciju baza pri čemu nastaju adeninski i timinski otvoreni prsteni, hidroksimetil urea i dr. (Imlay i Linn 1986. prema Babić i sur. 2007). Također, osim baza hidroksilni radikali mogu oksidirati i šećernu komponentu molekule DNA uzrokujući stvaranje jednolančanih i dvolančanih lomova te unakrsno vezanje molekule DNA na proteine (Mancini i sur. 2006). Zbog navedenih svojstava vodikov peroksid izabran je u ovom istraživanju kao modelni oksidirajući genotoksikant.

Dakle, za usporedbu količine oštećene DNA molekule nastale djelovanjem talij acetata, kao pozitivna kontrola u ovom istraživanju koristila sam vodikov peroksid.

Provela sam acelularni komet-test s jezgrama lista duhana u različitim koncentracijama 30% otopine H_2O_2 . Predmetna stakalca s jezgrama duhana stavila sam u Petrijeve zdjelice s prethodno priređenim koncentracijama H_2O_2 od: 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 mM u Tris-HCl-u (pH 7,5). Kao kontrolnu skupinu upotrijebila sam preparate izložene samo u 50 mL Tris-HCl-a. Uzorke sam držala 2 h u mraku pri temperaturi od 4 °C. Denaturaciju, elektroforezu, neutralizaciju, bojanje i analizu preparata izvodila sam kao i pri izvođenju komet-testa. Za svaku koncentraciju napravila sam po tri preparata te na svakom analizirala po 50 jezgara.

2.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statističku obradu podataka korišten je računalni program Statistica for Windows 4.0. Podaci su uspoređivani neparametrijskim «Mann-Whitney U-testom» (kao neparametrijski student t-test). Vrijednosti oštećenja DNA dobivene komet-testom su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Pri tumačenju rezultata statističke obrade kao značajni podaci su uzeti oni za koje je vrijedilo $p \leq 0,05$ (*), te $p \leq 0,01$ (**).

3. REZULTATI

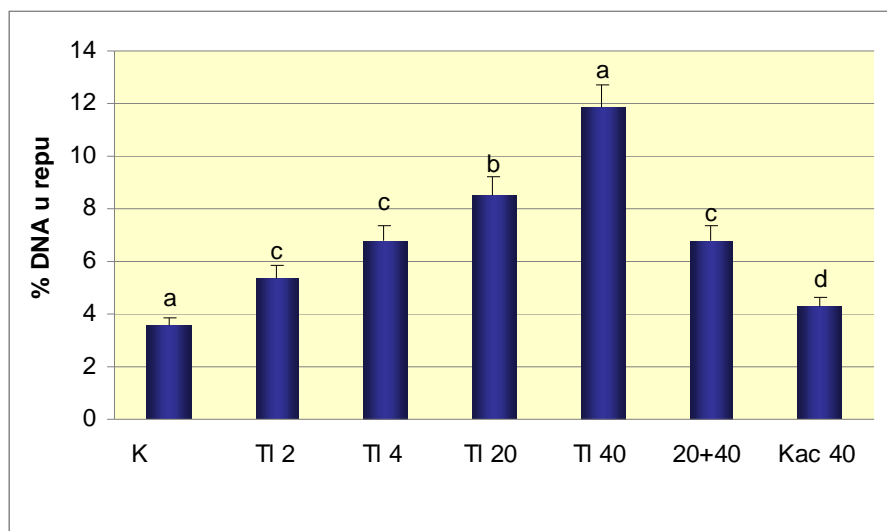
3.1. IZLAGANJE DUHANA TALIJEVOM(I) ACETATU U UVJETIMA *in vivo*

Oštećenje DNA u jezgrama stanica duhana (*Nicotiana tabacum* L. var Xanthi) nastalo djelovanjem talija prikazano je kao postotak DNA koja je tijekom elektroforeze migrirala u rep kometa (%DNA u repu). Za prikaz rezultata komet-testa također se mogu upotrijebiti vrijednosti duljine repa i repnog momenta (umnožak duljine repa i %DNA u repu kometa). Međutim, te vrijednosti su pod većim utjecajem uvjeta u kojima se test provodi (vrijeme denaturacije i elektroforeze), a koji mogu smanjiti migraciju DNA te tako djelovati na duljinu repa i iznos repnog momenta (Fairbairn i sur. 1995, Mitchelmore i sur. 1998).

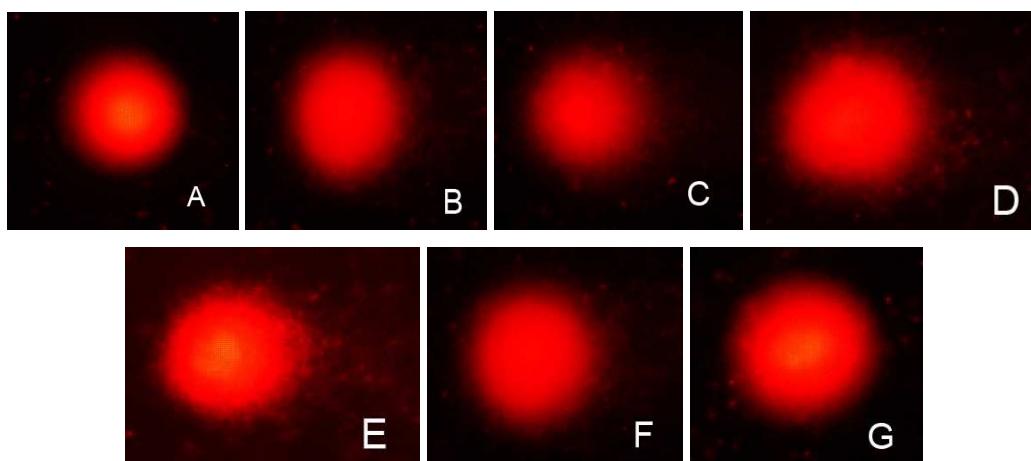
Rezultati celularnog komet-testa pokazali su da se nakon 72-satnog izlaganja duhana rasponu koncentracija talijeva(I) acetata javlja oštećenje DNA u korijenu i listu biljke koje je linearno ovisno o koncentraciji. Biljke tretirane najmanjom koncentracijom talijeva(I) acetata (2 μ M) pokazuju blagi, ali statistički značajan porast postotka DNA u repu kometa. Pri toj koncentraciji u korijenu (Slika 12) javlja se porast postotka DNA u repu kometa za 1,5 puta (5,6 %DNA u repu) u odnosu na kontrolni uzorak (3,5 %DNA u repu), a u listu (Slika 14) za 1,3 (3,1 %DNA u repu) puta u odnosu na kontrolni uzorak (2,4 %DNA u repu). Najveće oštećenje javlja se pri koncentraciji od 40 μ M talijeva(I) acetata. Pri toj koncentraciji oštećenje u korijenu je 3,4 puta (11,9 %DNA u repu), a oštećenje u listu 2,6 puta (6,2 %DNA u repu) veće u odnosu na kontrolni uzorak. Rezultati pokazuju da je ukupno oštećenje DNA duhana veće u korijenu nego u listu biljke te raste s porastom koncentracije talijeva(I) acetata. Na slici 14 se može uočiti veće oštećenje DNA pri koncentraciji od 4 μ M nego pri 20 μ M, ali ono nije statistički značajno.

Kao kontrolni uzorak također je korištena 40 μ M otopina kalijeva acetata koja nema genotoksični učinak, odnosno ne izaziva oštećenje molekule DNA.

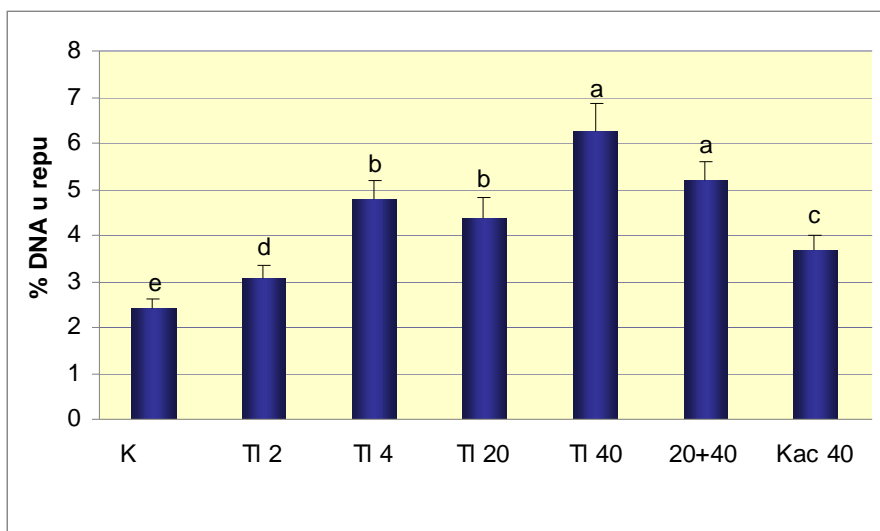
Kako talij interferira s kalijem pri ulasku u stanice, proveden je i komet-test u otopini koncentracije 20 μ M talijeva(I) acetata + 40 μ M kalijeva acetata. U korijenu je pri toj koncentraciji, komet-test pokazao statistički značajno manje oštećenje molekule DNA za 1,9 puta nego otopina 20 μ M talijeva(I) acetata koja oštećuje DNA za 2,43 puta u odnosu na kontrolu (3,5 %DNA u repu).



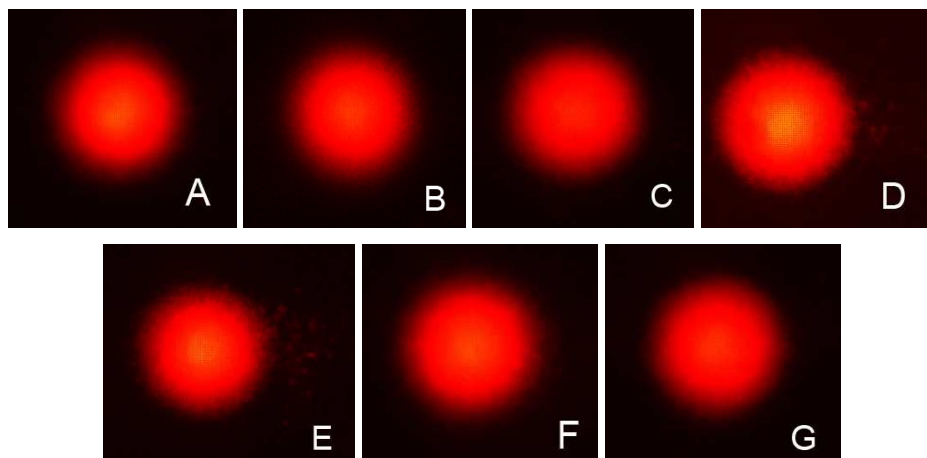
Slika 12. Oštećenje DNA (% DNA u repu) u jezgrama stanica korijena duhana mjereno komet-testom nakon 72-satnog izlaganja 0 (K), 2, 4, 20, 40 μM otopine talijeva(I) acetata te 20 μM talijeva(I) acetata + 40 μM kalijeva acetata i 40 μM kalijeva acetata u uvjetima *in vivo*. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0,05$).



Slika 13. Jezgre stanica korijena duhana tretirane: 0 (A), 2 (B), 4 (C), 20 (D), 40(E) μM talijevim(I) acetatom te 20 +40 μM (TIAC + KAc) (F) i 40 μM kalijevom acetatom (G) nakon komet-testa.



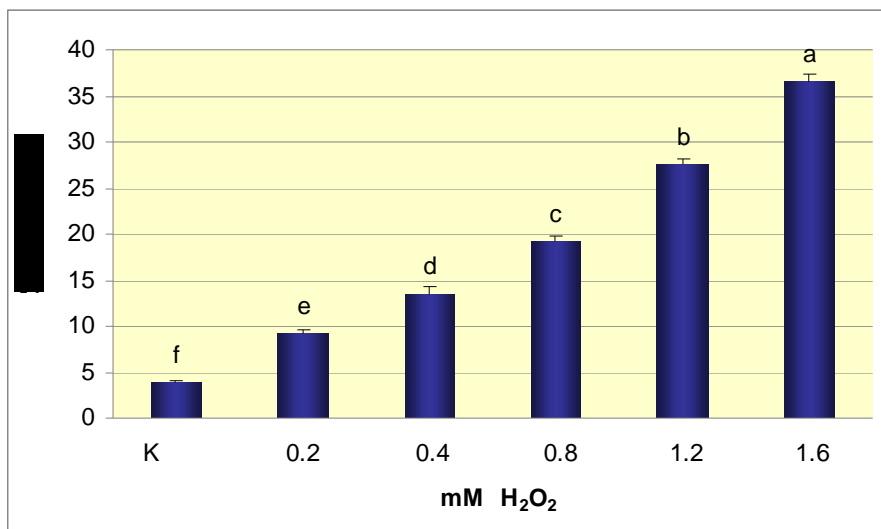
Slika 14. Oštećenje DNA (%DNA u repu) u jezgrama stanica lista duhana nakon 72-satnog izlaganja 0 (K), 2, 4, 20, 40 μM otopine talijeva(I) acetata te 20 μM talijeva(I)acetata + 40 μM kalijeva acetata i 40 μM kalijeva acetata u uvjetima *in vivo*. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0,05$).



Slika 15. Jezgre stanica lista duhana tretirane: 0 (A), 2 (B), 4 (C), 20 (D), 40(E) μM talijevim(I) acetatom te 20 +40 μM (TIAC + KAC) (F) i 40 μM kalijevim acetatom (G) nakon komet-testa.

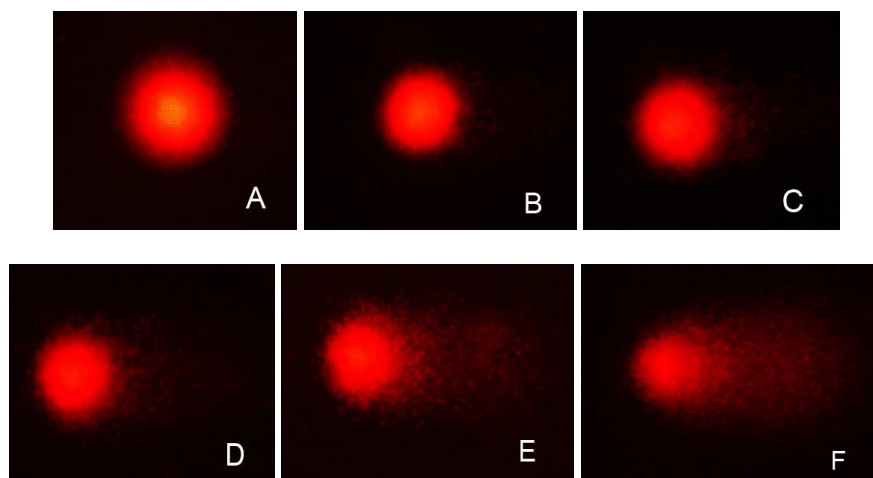
3.2. IZLAGANJE JEZGRI DUHANA U UVJETIMA *in vitro*

Izmjeren je učinak vodikova peroksida na izolirane jezgre stanica lista duhana. Rezultati acelularnog komet-testa pokazali su da već i najniža koncentracija vodikova peroksida izaziva značajna oštećenja nakon dva sata inkubacije. Tako je u jezgrama tretiranim s 0,2 mM vodikova peroksida postotak DNA u repu porastao za 2,25 puta (9% DNA u repu), dok je 1,2 mM vodikov peroksid povećao postotak DNA u repu za čak 9,2 (36,5% DNA u repu) puta u odnosu na kontrolni uzorak (4 %DNA u repu).



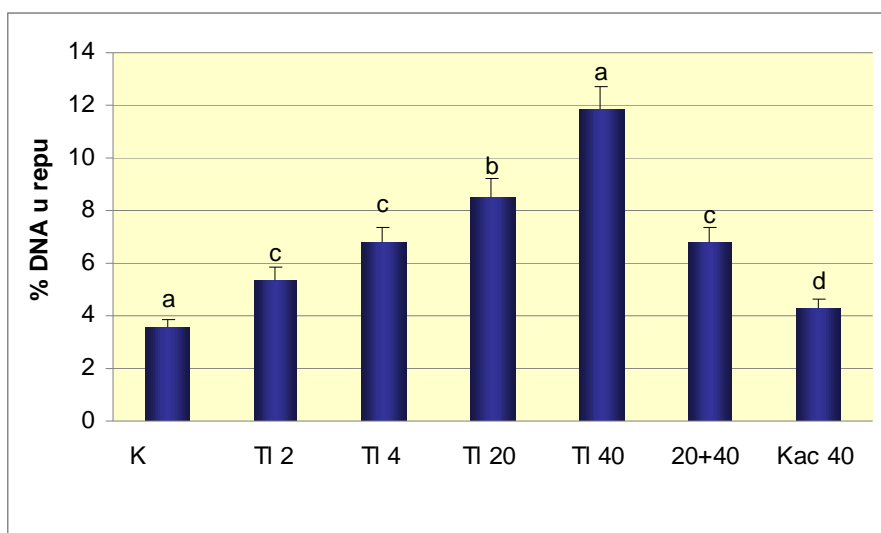
Slika 16. Oštećenje DNA (% DNA u repu) u jezgrama duhana mjereno komet-testom nakon dvosatnog izlaganja 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 mM vodikovom peroksidu u uvjetima *in vitro*. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0,05$).

Oštećenje DNA (%DNA u repu kometa) nakon izlaganja jezgri duhana vodikovom peroksidu puno je veće od oštećenja DNA nakon izlaganja talijevom(I) acetatu, što se jasno može vidjeti na slici 17. S porastom koncentracije vodikovog peroksida raste i oštećenje, tj. duži su „repovi“ kometa.

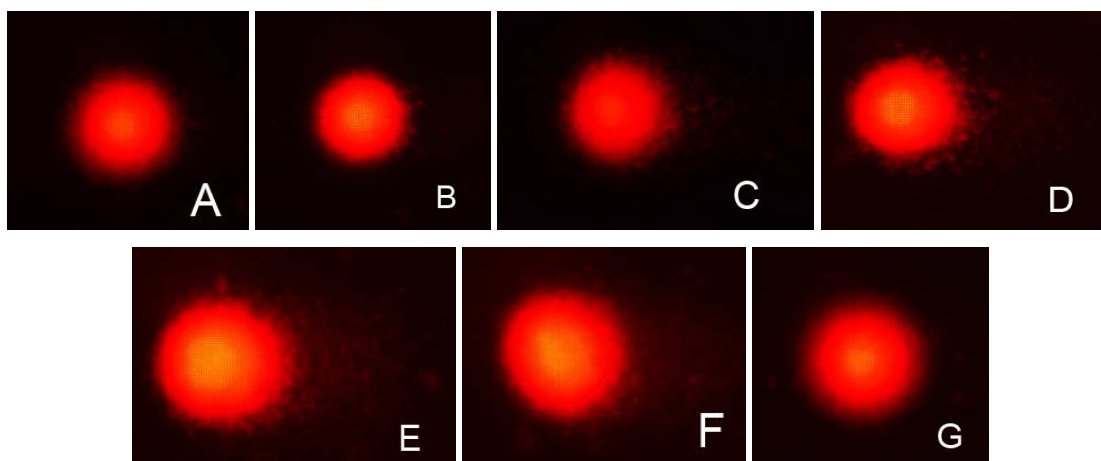


Slika 17. Jezgre iz stanica lista duhana tretirane: 0 (A), 0,2 (B), 0,4 (C), 0,8 (D), 1,2 (E), 1,6 (F) mM vodikovim peroksidom nakon acelularnog komet-testa.

Acelularni komet-test u rasponu korištenih koncentracija talijeva(I) acetata također je pokazao statistički značajan genotoksičan učinak na jezgre stanica lista duhana iako maksimalna vrijednost od 11,9% DNA u repu kometa pri koncentraciji od 40 μ M talijeva(I) acetata približno odgovara oštećenju koje izaziva vodikov peroksid u najmanjoj koncentraciji (0,2 mM).



Slika 18. Oštećenje DNA (% DNA u repu) u jezgrama stanica lista duhana mjereno komet-testom nakon dvosatnog izlaganja 2, 4, 20, 40 μ M talijevom(I) acetatu, 20 + 40 μ M (TIAc + Kac) i 40 μ M kalijevom acetatu u uvjetima *in vitro*. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0,05$).



Slika 19. Jezgre iz stanica lista duhana tretirane: 0 (A), 2 (B), 4 (C), 20 (D), 40(E) μM talijevim(I) acetatom te 20 +40 μM (TlAc + KAc) (F) i 40 μM kalijevim acetatom (G) nakon acelularnog komet-testa.

Na slici 19 vidljivo je puno manje oštećenje jezgara duhana nakon tretmana s talijevim(I) acetatom u uvjetima *in vitro*.

4. RASPRAVA

Biljke pokazuju razne prednosti kao testni organizmi. Primjerice razvoj i održavanje biljaka u laboratorijskim uvjetima puno je jednostavnije od uvjeta uzgoja animalnih organizama. Biljni organizmi imaju kratko generacijsko vrijeme, visoku osjetljivost, pokazuju morfološke, fiziološke, biokemijske i kromosomske promjene koje se mogu mjeriti u kratkom roku nakon izlaganja stresnim uvjetima. Također je moguće jednostavno praćenje učinka razvoja biljnih organizama u različitim uvjetima (pH vrijednost, temperatura i osvjetljenje).

Što se tiče genotoksičnosti, na biljkama se može detektirati široki raspon genetičkog oštećenja. Biljke ne samo da mogu otkriti mutagenost originalne kemikalije, već i njenih metabolita jer stanice imaju enzime za transformaciju promutagena u mutagen, a biotransformacija kemikalija kvalitativno je slična u biljnih i životinjskih organizama ([http 1](http://1)). Bitna činjenica je da rezultati dobiveni na biljnim organizmima pokazuju visoku korelaciju s rezultatima na životinjskim organizmima stoga su biljke našle široku primjenu u izvođenju biotestova u laboratorijskim uvjetima i za monitoring svih dijelova biosfere (zrak, tlo i voda) ([http 1](http://1)).

Testiranje genotoksičnosti teških metala čija se koncentracija u okolišu povećava, važno je pri procjeni ugroženosti biološke raznolikosti i općeg stanja ekosistema.

Ovim istraživanjem nastojala se utvrditi genotoksičnost teškog metala talija na modelni biljni organizam *Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi.

Genotoksičan učinak može biti uvjetovan direktnim i indirektnim djelovanjem metala na molekulu DNA. Direktan učinak podrazumijeva interakciju metala s bazom, fosfatnom ili šećernom komponentom molekule DNA. Tako je utvrđeno da se kadmij veže na baze (adenin, gvanin i timin) (Gichner i sur. 2004), a olovo na fosfatne skupina (Vajpayee i sur. 2006). Indirektan učinak na molekulu DNA češći je od direktnog, a temelji se na reakcijama s proteinima i drugim molekulama koje sudjeluju u održavanju strukture i funkcije molekule DNA. Gichner i sur. (2004) navode da je indirektna genotoksičnost kadmija u duhanu posljedica povećanja reaktivnih vrsta kisika (ROS, *reactive oxygen species*) kao što su hidroksidni radikal, superoksidni radikal i vodikov peroksid. Kadmij u stanicama iskorištava stanične antioksidanse i enzime, posebno one koji sadrže tiolnu skupinu te dolazi do poremećaja ravnoteže i nastupa stanje poznato kao «oksidacijski stres». U stanicama koje su pod oksidacijskim stresom javljaju se razna oštećenja proteina, lipida i molekule DNA.

Za utvrđivanje prisutnosti indirektne i direktne toksičnosti talija na duhanu koristila sam celularni odnosno acelularni komet-test. U posljednjih desetak godina komet-test je postao jedna od glavnih metoda za procjenu genotoksičnog učinka ksenobiotika (Dixon i sur. 2002).

Rezultati dobiveni izlaganjem duhana u uvjetima *in vivo* rasponu koncentracija talijeva(I) acetata pokazuju da se nakon 72 sata u korijenu biljke javlja statistički značajno, ali blago oštećenje DNA. Oštećenje DNA raste s povećanjem koncentracije talijeva(I) acetata te pri najnižoj koncentraciji od 2 μM iznosi 5,6% DNA u repu i veće je od kontrolnog uzorka za 1,5 puta. Pri sljedećoj koncentraciji od 4 μM (TlAc) %DNA u repu se penje na 6,8%, ali se statistički značajno ne razlikuje od 2 μM TlAc. Koncentracija od 20 μM TlAc pokazuje statistički značajan skok naspram prethodne koncentracije i iznosi 8,5% DNA u repu te je veća od kontrole za 2,29 puta. Također je i učinak najviše koncentracije TlAc bio statistički značajan, te je pri koncentraciji od 40 μM 11,9% DNA u repu nakon komet-testa. Istraživanje genotoksičnog utjecaja kadmija koje su proveli Gichner i sur. (2004) nakon tretmana od 24 sata, u korijenu duhana pokazao je statistički značajan i veći genotoksični učinak od talija nakon 72 sata. Tako kadmij pri koncentraciji od 20 μM uzrokuje 25% DNA u repu kometa (3,1 puta veće od kontrole), pri koncentraciji od 40 μM uzrokuje 48% DNA u repu (6 puta veće od kontrole), a pri najvišoj koncentraciji od 100 μM uzrokuje više od 70 %DNA u repu kometa.

U listu duhana izloženih rasponu koncentracija talijeva(I) acetata također se primjećuje statistički značajan porast %DNA u repu, ali su mu vrijednosti približno dvostruko manje od onih dobivenih u korijenu. Tako je %DNA u repu pri koncentraciji od 2 μM 3,1%, a pri najvećoj koncentraciji od 40 μM 6,2%. Vrijednosti koje su dobili Gichner i sur. (2004) na jezgrama stanica lista duhana izloženih kadmiju nakon 24 sata pokazali su znatno manje oštećenje nego u korijenu te navode da je razlog tome veća akumulacija kadmija u korijenu i veća količina antioksidansa u listu koji štite od ROS-ova nastalih kao posljedica toksičnog utjecaja kadmija. Pri svim koncentracijama kadmija (20, 40, 60, 80 μM) vrijednosti %DNA u repu jezgri lista kretale su se oko kontrolne vrijednosti od 10% te nisu bile statistički značajne. Dakle, iako su vrijednosti %DNA u repu jezgri lista duhana tretiranog talijem bile niže od vrijednosti koje su dobili Gichner i sur. (2004), ipak pokazuju statističku značajnost, jer povećanjem koncentracije talijeva(I) acetata povećava se i oštećenje DNA.

Rezultati celularnog komet-testa na vodenoj leći *Lemna minor* L. izloženoj sedam dana rasponu koncentracija talijeva(I) acetata, također su pokazali blagi, statistički značajan genotoksičan učinak talija. Tako pri koncentraciji od 2 μM talijeva(I) acetata %DNA u repu

iznosi 7,5% i veći je za 1,43 puta u odnosu na kontrolne biljke dok koncentracija od 10 μ M TIAC uzrokuje 33% DNA u repu (Babić 2007).

S obzirom da talij interferira s kalijem prilikom ulaska u stanicu (Babić 2007) također je mjereno oštećenje DNA u stanicama duhana nakon izlaganja otopini koja je sadržavala 20 μ M talijev(I) acetat i 40 μ M kalijev acetat. Rezultati dobiveni na jezgrama korijena biljke pokazuju da veća koncentracija kalija uzrokuje veći ulazak kalija u stanice što je rezultiralo manjim, statistički značajnim oštećenjem DNA te %DNA u repu pri toj koncentraciji iznosi 6,2%, dok pri tretmanu s 20 μ M talijevom(I) acetatu iznosi 8,2%. To potvrđuje tvrdnju da se talij natječe s kalijem prilikom ulaska u stanicu. U listu se rezultati malo razlikuju i dobiveno je veće oštećenje pri tretmanu s 20 + 40 μ M talijeveva(I) acetata + kalijeva acetata nego pri 20 μ M talijeva(I) acetata, a razlog tome mogu biti različiti načini akumuliranja metala u listu biljke.

Acelularni komet-test nakon tretmana s talijevim(I) acetatom na jezgrama lista duhana dao je jednake rezultate kao i celularni komet-test proveden na jezgrama korijena duhana pokazujući blagi, statistički značajan genotoksični učinak. Rezultati istraživanja djelovanja kadmija izraženi u obliku repnog momenta (umnožak dužine repa i % DNA u repu) pokazuju veliku razliku u celularnom i acelularnom komet-testu. Kadmij u rasponu koncentracija 0,2–1,6 mM u celularnom komet-testu pokazuje veliki porast repnog momenta od 6 μ M (kontrola) do 42 μ M pri najvećoj koncentraciji. Vrijednost dobivene nakon acelularnog testa, ne pokazuju značajan rast, pa tako pri najvećoj koncentraciji od 1,6 mM repni moment iznosi 12 μ m (Gichner i sur. 2004). Rezultati se također ne podudaraju s rezultatima na vodenoj leći u kojoj direktno izlaganje jezgri rasponu koncentracija talijeva(I) acetat nije pokazalo oštećenje molekule DNA (Babić 2007). Razlog tome može biti činjenica da različite biljne vrste različito reagiraju na istu koncentraciju metala ovisno o stupnju ploidije, ukupnoj dužini diploidnog kompleta i broju metacentričnih kromosoma (Patra i sur. 2004). Acelularni komet-test ne provodi se na izoliranim jezgrama duže od 2 sata jer su one puno osjetljivije na okolni stres nego jezgre koje su u stanici zaštićene staničnom membranom i stjenkom. Izolirana jezgra je puno osjetljivija na različite okolišne faktore (svjetlost, temperatura, pH) te se može javiti veće oštećenje DNA i kao posljedica tih čimbenika. Moguće je da se zbog toga moji rezultati acelularnog testa ne podudaraju s navedenim istraživanjima.

Kao pozitivna kontrola korišten je modelni genotoksikant vodikov peroksid koji je nakon acelularnog komet-testa pokazao značajan genotoksičan učinak s puno većim vrijednostima parametra za oštećenje DNA (%DNA u repu) nego celularni i acelularni komet-test s

talijevim(I) acetatom. Mutageni učinak vodikova peroksida već su i ranije potvrdili Gichner i Stavreva (2002) te također Mancini i sur. (2006). Korištenjem tog modelnog genotoksikanta kao pozitivne kontrole potvrdili smo ujedno i osjetljivost komet-testa na duhanu a u svrhu detekcije genotoksičnog učinka.

Komet-test je pokazao da i pri vrlo malim koncentracijama potencijalnog genotoksikanta može detektirati oštećenje molekule DNA u stanicama duhana. Gichner i sur. (2004) navode da je vrsta *Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi osjetljivi testni organizam jer osim oštećenja DNA koja se javljaju u stanicama, može pokazati i somatske mutacije kao što su pojava tamno zelenih i žutih promjena na svijetlo zelenim listovima. U ovom istraživanju nisu opažene promjene na listu duhana kao posljedica mutacija.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata istraživanja genotoksičnog učinka talijeva(I) acetata i vodikova peroksida komet-testom na vrstu *Nicotiana tabacum* var. Xanthi mogu zaključiti slijedeće:

1. Izlaganje jezgri stanica lista duhana oksidirajućem genotoksikantu H_2O_2 u acelularnom komet-testu, rezultiralo je oštećenjem DNA te je potvrđena osjetljivost komet-testa za određivanje genotoksičnog oštećenja u biljnim stanicama.
2. Utvrđen je blagi genotoksični učinak talijeva(I)acetata u stanicama korijena i lista biljaka duhana izloženih različitim koncentracijama talijeva(I) acetata tri dana u uvjetima *in vivo*.
3. Acelularni komet-test je pokazao blago genotoksično djelovanje talijeva(I) acetata na jezgre stanica lista duhana.
4. Duhan, *Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi se pokazao kao osjetljiv testni organizam za procjenu genotoksičnog učinka talij(I)acetata komet-testom.

6. LITERATURA

Babić M. (2007): Učinak talijeva(I) acetata na vodenu leću *Lemna minor* L. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Cvjetko P., Cvjetko I., Pavlica M. (2009): Thallium Toxicity in Humans. Arh Hig rada Toksikol (u tisku).

Dixon D. R., Pruski A. M., Dixon L. R. J., Jha A. N. (2002): Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. Mutagenesis 17: 195-507.

Emsley J. (2003): Nature's building blocks . An A-Z guide to the elements. Oxford University press, Oxford.

Fairbairn D. W., Olive P. L., O'Neill K. L. (1995): The comet assay: a comprehensive review. Mutat Res 339: 37-59

Filipović I., Lipanović S. (1995): Opća i anorganska kemija, 2. dio. Školska knjiga, Zagreb.

Frattini P. (2005): Thallium properties and behaviour – a literature study. Geological survey of Finland, GTK.

Galvan-Arzate S., Santamaria A. (1998): Thallium toxicity. Toxicol Lett 99: 1-13.

Gedik C., M., Ewen S. W. B., Collins A. R. (1992): Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. Int Rad Biol 62: 313-320.

Gichner T., Stavreva D. A. (2002): DNA damage induced by hydrogen peroxide in cultured tobacco cells is dependent on the cell growth stage. Mutat Res 514: 147-152.

Gichner T., Patkova Z., Szakova J., Demnerova K. (2004): A cadmium induced DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. Mutat Res 559: 49-57.

Habuš, Stričević i Tomašević (1998): Anorganska kemija. Profil, Zagreb.

Heim M., Wappelhorst O., Markert B. (2002): Thallium in the terrestrial environments – and effects. *Ecotoxicology* 11: 369-377.

Hoffman R. S., Stringer J. A., Feinberg E. S., Goldfrank L. R. (1999): Comparative efficacy of thallium adsorption by activated charcoal, Prussian blue, and sodium polystyrene sulfonate. *Clin Toxicol* 37:833-837.

John Peter A. L., Viraraghavan T. (2005): Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Environ Int* 31: 493-501.

Kazantzis G. (2000): Thallium in the environment and health effects. *Environ Geochem Health* 22: 275-280.

Kurelec B. (1993): The genotoxic disease syndrome. *Mar Environ Res* 35:341-348.

Lee R. F., Steinert S. (2003): Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and fresh water) animals. *Mutat Res* 544:43-64.

Lin T. S., Nriagu J., Wang X. Q. (2001): Thallium concentration in lake trout from Lake Michigan. *Bull Environ Contam Toxicol* 67: 921-925.

Livingstone D. R. (2001): Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Mar Poll Bull* 42: 656-666.

Mancini A., Buschini A., Restivo F. M., Rossi C., Poli P. (2006): Oxidative stress as DNA damage in different tobacco plants. *Plant Sci* 170: 845-852.

Mallick N. (2004): Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. *J. Plant Physiol* 161: 591-597.

Mallick N., Rai L. C. (2002): Physiological responses of non-vascular plants to heavy metals. U: Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Prasad MNV, Strzałka K (ur). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, str 112- 148.

Mitchelmore C. L., Birmelin C., Livingstone D. R., Chipman K. (1998): DNA strand breaking in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat Res* 399: 135-147.

Mulkey J. P., Oheme F. W. (1993): A review of thallium toxicity. *Vet Human Toxicol* 35: 445-453.

Patra M., Bhowmik N., Bandopadhyay B., Sharma A. (2004): Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant system and development of genetic tolerance. *Environ Exp Bot* 52: 199-223.

Pavlica M., Klobučar G. I. V., Mojaš N., Erben R., Papeš D. (2001): Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutat Res* 490: 209-214.

Perl-Treves R., Perl A. (2002): Oxidative stress an inducton. U: Oxidative stress in plants. Inzé D, Van Montagu M (ur). Taylor & Francis Inc., London and New York, str 1-32.

Rojas E., Lopez M. C., Valverde M. (1999): Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*: 225-254.

Scheckel K. G., Lombi E., Rock S. A., McLaughlin M. J. (2004): *In vivo* synchrotron study of thallium speciation and compartmentation in *Iberis intermedia*. *Environ Sci Technol* 38: 5095- 5100.

Sertić M. (2005): Procjena genotoksičnosti kopnenih voda testovima komet i mikronukleus na eritrocitima šarana. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Steinert S. A., Streib Montee R., Lether J. M., Chadwick D. B. (1998): DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat Res* 399: 65-85.

Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J-C., Sasaki Y. F. (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*;35(3): 206-21.

Tremel A., Masson P., Garraud H., Donard O. F. X., Baize D., Mench M.(1997): Thallium in French agrosystems –II. Concentracion of thallium in field-grown rape and some other speaces. Environ Pollut 97: 161-168.

Vajpayee P., Dhawan A., Shanker R. (2006): Evaluation of the alkaline comet assay induced with the watlands plant *Bacopa monneri* L: as a model for ecogenotoxicity assesment. Environ Mol Mut 47: 483-489.

Wallwork-Barber M. K., Lyall K., Ferenbaugh R. W. (1985): Thallium movement an a simple aquatic ecosystem. J Environ Sci Health 20: 689-700.

Wierzbicka M., Szarek-Lukaszewska G., Grodzinska K. (2004): Highly toxic thallium in plants from thr vicinity of Olkusz (Poland). Ecotoxicol Environ Safety 59: 84-88.

Xiao t., Guha J., Boyle D., Liu C-Q., Zheng B., Willson G. C., Rouleau A., Chen J. (2004): Naturally occuring thallium: a hidden geoenviromental health hazard? Environ Int 30: 501-507.

Zhou D-X., Liu D-N. (1985): Cronic thallium poisoning in a rural area of Guizhou province, China. J Environ Health 48: 14-18.

Internet stranice:

http 1: <http://www.biol.pmf.hr/~gklobuca/rakovi/indeks.htm>

http 2: <http://af.unmo.ba/Zagadivanje%20zemljista%20teskim%20metalima.pdf>

http 3: <http://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/tl/spojevi.html#SPOJEVI>